

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento

**Boletim de Pesquisa 78**  
**e Desenvolvimento** ISSN 0103-0841  
Dezembro, 2006

**Indução de Multibrotações In Vitro,  
a partir de Gemas Cotiledonares de  
Algodão da Cultivar CNPA 98-1034**



**Embrapa**

**República Federativa do Brasil**

*Luiz Inácio Lula da Silva*  
Presidente

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

*Luís Carlos Guedes Pinto*  
Ministro

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

**Conselho de Administração**

*Luis Carlos Guedes Pinto*  
Presidente

*Silvio Crestana*  
Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*

*Hélio Tollini*

*Ernesto Paterniani*

*Cláudia Assunção dos Santos Viegas*

Membros

**Diretoria Executiva da Embrapa**

*Silvio Crestana*  
Diretor-Presidente

*Tatiana Deane de Abreu Sá*

*José Geraldo Eugênio de França*

*Kepler Euclides Filho*

Diretores Executivos

**Embrapa Algodão**

*Robério Ferreira dos Santos*  
Chefe Geral

*Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão*  
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Maria Auxiliadora Lemos Barros*  
Chefe Adjunto de Administração

*José Renato Cortez Bezerra*  
Chefe Adjunto de Comunicação e Negócios



ISSN 0103-0841  
Dezembro, 2006

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão

## ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 78***

### **Indução de Multibrotações *In Vitro*, a partir de Gemas Cotiledonares de Algodão da Cultivar CNPA 98-1034**

Marcia Soares Vidal  
Julita Maria Frota Chagas Carvalho  
Adriana Carneiro Tavares  
Morganna Pollynne Nóbrega Pinheiro  
Jeane Ferreira Jerônimo

Campina Grande, PB.  
2006

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

**Embrapa Algodão**

Rua Osvaldo Cruz, 1143 – Centenário  
Caixa Postal 174  
CEP 58107-720 - Campina Grande, PB  
Telefone: (83) 3315-4300  
Fax: (83) 3315-4367  
algodao@cnpa.embrapa.br  
<http://www.cnpa.embrapa.br>

**Comitê de Publicações**

Presidente: Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão

Secretária: Nívia Marta Soares Gomes

Membros: Cristina Schetino Bastos

Fábio Akiyoshi Suinaga

Francisco das Chagas Vidal Neto

José Américo Bordini do Amaral

José Wellington dos Santos

Luiz Paulo de Carvalho

Nair Helena de Castro Arriel

Nelson Dias Suassuna

Supervisor Editorial: Nívia Marta Soares Gomes

Revisão de Texto: Marcia Soares Vidal

Tratamento das ilustrações: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

Capa: Flávio Tôres de Moura/Maurício José Rivero Wanderley

Editoração Eletrônica: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

**1ª Edição**

1ª impressão (2006): 500 exemplares

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

---

EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB).

Indução de Multibrotações *In Vitro*, a partir de Gemas Cotiledonares de Algodão da Cultivar CNPA 98-1034, por Marcia Soares Vidal e outros. Campina Grande, 2006.

14p. (Embrapa Algodão. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 78).

1. Biotecnologia. I. Vidal, M.S. II. Carvalho, J.M.F.C. III. Tavares, A.C. IV. Pinheiro, M.P.N. V. Jerônimo, J.F. VI. Título. VII. Série

CDD 620.8

## Sumário

Resumo .....	6
Abstract .....	7
Introdução .....	8
Material e Métodos.....	9
Resultados e Discussão .....	10
Conclusões .....	12
Referências Bibliográficas .....	13

# **Indução de Multibrotações *In Vitro*, a partir de Gemas Cotiledonares de Algodão da Cultivar CNPA 98-1034**

---

Marcia Soares Vidal<sup>1</sup>

Julita Maria Frota Chagas Carvalho<sup>2</sup>

Adriana Carneiro Tavares<sup>3</sup>

Morganna Pollynne Nóbrega Pinheiro<sup>3</sup>

Jeane Ferreira Jerônimo<sup>3</sup>

## **Resumo**

Em algodão, o processo de transformação ainda é difícil, por que depende de protocolos eficientes de embriogênese somática, assim o desenvolvimento de métodos alternativos para a regeneração de algodão é necessário. O presente trabalho teve por objetivo selecionar meio(s) de cultivo ideal(is) capazes de induzir a formação de multibrotações de gemas axilares na cultivar CNPA 98-1034 de algodão (*Gossypium hirsutum* L). As sementes selecionadas foram desinfestadas e mantidas em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), para desenvolvimento da plântula. Dessas plântulas foi extraído o nó cotiledonar, colocados em frascos contendo meio MS sem suplementação de hormônios (controle) ou suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> cinetina (KIN) com as seguintes concentrações do hormônios 6-Benzilaminopurina (BAP) (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg.L<sup>-1</sup>), resultando em seis diferentes tratamentos enumerados de MB 0 (livre de hormônio) a MB 5. Dez frascos contendo três explantes cada um foram empregados por tratamento. Os frascos foram mantidos durante 45 dias e, então, foi coletado o número de brotos por explante e submetido à análise estatística. Os dados foram analisados mediante o procedimento "General Linear Model (GLM)" do SAS, destacando-se o meio MS suplementado com as combinações de 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de KIN.

---

<sup>1</sup>Bióloga, DSc., Embrapa Agrobiologia, Rodovia BR 465, Km 07, CP 74505, CEP 23890-000, Seropédica, RJ. E-mail: marcia@cnpab.embrapa.br

<sup>2</sup>Eng. Agr., DSc., Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, CP 174, CEP: 58107-720 Campina Grande, PB. E-mail: julita@cnpa.embrapa.br

<sup>3</sup>Estagiários da Universidade Estadual da Paraíba, CEP 58109-753, Campina Grande, PB.

## ***In Vitro* Multiple Shoots Induction From CNPA 98-1034 Cotton Cotyledonary Buds**

---

### **Abstract**

Cotton transformation remains difficult, because it depends of efficient protocols of somatic embryogenesis, so the development of alternative methods of cotton regeneration is necessary. The present work aimed at selecting medium that could induce multiple shoot formation from CNPA 98-1034 (*Gossypium hirsutum* L.) cotyledonary buds. Selected seeds were desinfested and maintained in MS (Murashige and Skoog, 1962) basal medium until plantlet development. Cotyledonary nodes from these plantlets were extracted and subcultured in baby food vessels containing MS medium supplemented with different combinations of 6-Benzylaminopurine (BAP) (1.0; 1.5; 2.0; 2.5 and 3.0 mg.l<sup>-1</sup>) and Kinetin (KIN) (1.0 mg.l<sup>-1</sup>) and numbered from MBO (MS free of hormones) to MB5. Ten flasks were used for each treatment with three explants per flask. The treatments were maintained for 45 days and then the number of shoots from each explant was collected and statistic analyzed. The data were analyzed by using the General Linear Model (GLM) of SAS program. MS medium supplemented with 2.5 mg.l<sup>-1</sup> of BAP and 1.0 mg.l<sup>-1</sup> of KIN produced the highest number of shoots.

Termos para indexação: tissue culture, micropropagation,

## Introdução

O algodoeiro é uma planta dicotiledônea da família Malvaceae, pertencente ao gênero *Gossypium*, possuindo 52 espécies conhecidas. Destas espécies, apenas quatro são cultivadas: *Gossypium arboreum* L., *Gossypium herbaceum* L., *Gossypium hirsutum* L. e *Gossypium barbadense* L. As demais espécies são silvestres, não sendo exploradas comercialmente.

A espécie *Gossypium hirsutum* L. fornece a maioria da fibra produzida mundialmente, contribuindo com cerca de 90% do total mundial produzido ().

A fibra do algodoeiro possui mais de 400 aplicações industriais, dentre as quais pode-se citar: confecção de fios para a tecelagem de vários tipos de tecidos, preparação de algodão hidrófilo para enfermagem, confecção de feltro, cobertores e estofamentos, obtenção de celulose dentre outros (CORRÊA, 1989 citado por RICHETTI e MELO FILHO, 2001).

Os programas de melhoramento genético do algodoeiro têm possibilitado a obtenção de cultivares mais produtivas, precoces e de alto rendimento de fibras, sendo estas finas, resistentes e uniformes. É importante ressaltar que as técnicas de cultura de tecidos muitas vezes constituem-se em complemento importante no desenvolvimento de estudos de genética e melhoramento de plantas.

A cultura de tecidos é um processo, através do qual, pequenos fragmentos de tecido vivo (explantos) são isolados de um organismo e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos em um meio nutritivo semi-definido ou definido (MANTELL et al., 1994). Através desta técnica torna-se possível à obtenção de um grande número de plantas saudáveis e uniformes, em um curto período de tempo.

A cultura de células e tecidos vegetais é uma área da biotecnologia, que está sendo empregada na manutenção de coleções vivas dos mais variados tipos de espécies vegetais de importância econômica ou em extinção (BORÉM e SANTOS, 2004). No caso do algodoeiro, por se tratar de uma cultura de grande valor econômico, a cultura de tecidos constitui-se numa técnica altamente importante e amplamente utilizada, pois em curto e médio prazo pode-se obter um maior número de genótipos de algodão. Além desses aspectos, as espécies micropropagadas apresentam as vantagens de serem multiplicadas em qualquer época do ano, em pequeno espaço físico.



De acordo com Rogalski et al. (2003), citado por Sousa (2004), a cultura de tecidos *in vitro* pode servir ainda como ferramenta auxiliar na eliminação de patógenos, possibilitando a obtenção de matrizes com qualidade genética e sanitária comprovada; no entanto, para a aplicação desta técnica, é necessário que o meio de cultivo, bem como, as condições de cultura para cada espécie e/ou variedade sejam otimizadas.

O presente trabalho teve por objetivo selecionar meio(s) de cultivo ideal(is) para induzir a formação de multibrotações de gemas cotiledonares em uma cultivar de algodão que brevemente será lançada. Para tal foi selecionada a cultivar CNPA 98-1034, tendo em vista que ap.

## Material e Métodos

Na execução deste trabalho utilizou-se o genótipo de algodão *Gossypium hirsutum* L. CNPA 98-1034, com sementes cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa do Algodão, em Campina Grande, PB. Os ensaios foram realizados utilizando-se plantas originadas a partir de sementes germinadas *in vitro* obtendo-se, posteriormente, os explantes.

Sementes selecionadas foram lavadas e desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio a 1% de cloro ativo (40 mL de hipoclorito de sódio – a 2,5%, e 60% de água deionizada), contendo 50 mL de Tween 20, sendo submetidos à agitação por 20 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas com água deionizada estéril por quatro vezes consecutivas e destinadas ao cultivo *in vitro*. O cultivo foi realizado em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 3% de sacarose e 0,55% de ágar e pH ajustado para 5,8. O meio foi previamente autoclavado à temperatura de 120°C por 20 minutos. As sementes foram então transferidas para meio de cultivo, sendo mantidas no escuro, por um período de 48-72 horas, até a germinação. Os tubos contendo as sementes germinadas foram transferidos para a câmara de crescimento ajustada para fotoperíodo de 16 h de luz/8h de escuro e intensidade luminosa de 30  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , a fim de que o desenvolvimento vegetal requerido (emissão de nó cotiledonar) fosse alcançado.

Após a emissão dos nós cotiledonares pelas plantas matrizes estes foram extraídos e transferidos para frascos contendo meio de cultura com diferentes

combinações dos hormônios 6-Benzilaminopurina - BAP (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg.L<sup>-1</sup>) e cinetina - KIN (1,0 mg.L<sup>-1</sup>) e enumerados de MBO (livre de hormônio) a MB5 de acordo com as combinações de hormônios. Foram utilizados dez repetições por tratamento, sendo que cada unidade experimental continha três explantes. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado.

Os frascos foram mantidos em câmara de crescimento por 45 dias sob as mesmas condições descritas acima. Adicionalmente, o desenvolvimento dos brotos foi observado diariamente por um período de 13 a 15 dias, após este período foi feita a repicagem dos explantes para novos meios contendo as mesmas concentrações de hormônios descritos anteriormente visando induzir o superbrotamento. Os explantes que apresentavam necrose ou contaminação foram descartados e, posteriormente, substituídos de modo a serem mantidas as repetições.

Após 45 dias do primeiro sub-cultivo foi feita a análise dos brotos emitidos pelos explantes.

Os dados foram analisados submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

## **Resultados e Discussão**

Os resultados da indução de superbrotamento em função dos meios de cultivo utilizados estão apresentados na Tabela 1, observando-se efeito significativo para o emprego das citocininas, BAP e KIN.

O tratamento que permitiu a obtenção do maior número de brotos foi o MB4 (MS + 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de KIN) (Figura 1), embora não diferindo estatisticamente do número de multibrotações apresentadas pelos demais meios contendo diferentes concentrações de BAP e KIN.

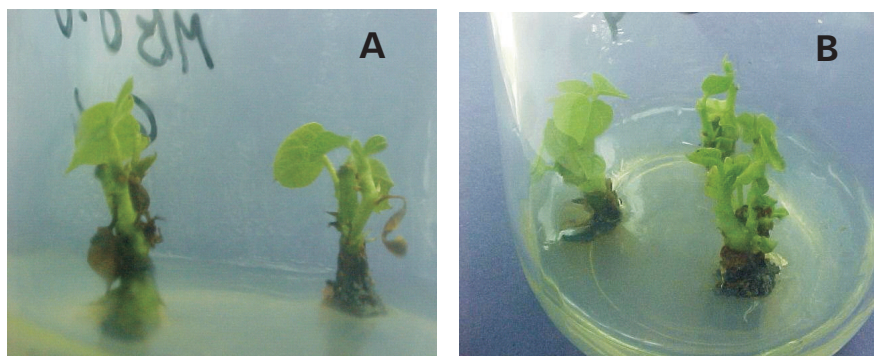
O emprego de citocininas na indução de múltiplos brotos vem sendo descrito para diversas culturas, como por exemplo: amendoim (FURTADO, 2004), gergelim (BATISTA et al., 2001) e, para o próprio algodão (AGRAWAL et al., 1997).

**Tabela 1.** Valores médios da indução de número de brotos por explante (NBE), referente a gemas axilares da cultivar de algodão CNPA 98-1034, conduzida em diferentes tratamentos contendo as citocininas (BAP e KIN).

Tratamentos	Variável	
	Número de Brotos/Explantes	Dados transformados em $y = \sqrt{x-1}$
MS	1,865	1,691 b
MS + 1,0 mg.L <sup>-1</sup> de KIN e 1,0 mg.L <sup>-1</sup> de BAP	3,365	2,081 ab
MS + 1,0 mg.L <sup>-1</sup> de KIN e 1,5 mg.L <sup>-1</sup> de BAP	4,564	2,350 a
MS + 1,0 mg.L <sup>-1</sup> de KIN e 2,0 mg.L <sup>-1</sup> de BAP	4,097	2,244 a
MS + 1,0 mg.L <sup>-1</sup> de KIN e 2,5 mg.L <sup>-1</sup> de BAP	4,996	2,410 a
MS + 1,0 mg.L <sup>-1</sup> de KIN e 3,0 mg.L <sup>-1</sup> de BAP	3,931	2,184 a
F <sub>tratamento</sub>		7,35 **
CV%		13,92

Médias seguidas das mesmas letras, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

\*\* Significativo ( $p < 0,01$ ) pelo teste F



**Fig. 1.** Indução de múltiplos brotos em nós cotiledonares da cultivar de algodão CNPA 98-1034. (A) Meio MS sem reguladores de crescimento (Testemunha); (B) Meio MS suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de KIN e 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

Carvalho et al. (2000), empregando os hormônios BAP e KIN como indutores de superbrotamento da cultivar de algodão CNPA 7H encontraram resultados satisfatórios, observando um maior número de brotos (brotos/explante) no meio MS suplementado com as concentrações de 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de KIN. No presente trabalho, no entanto, foi observado um maior índice de brotos

no meio suplementado com 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de KIN, indicando que para a cultivar de algodão em estudo (CNPA 98-1034), o aumento na concentração de BAP já foi capaz de induzir maior número de brotos, não sendo necessário um incremento de concentração KIN no meio de cultivo.

Lima et al. (2004) e Sousa et al. (2004) ao estudarem a indução do superbrotamento de outras cultivares de algodão (CNPA ITA 90II e BRS JATOBÁ) utilizando-se as citocininas BAP e KIN e, empregando como explante o ápice caulinar, também observaram efeito significativo no emprego destes fitohormônios.

## **Conclusões**

Observou-se que os valores médios entre os tratamentos: MB2, MB3, MB4 e MB5, obtiveram comportamentos idênticos, apresentando superioridade no MB4.

## Referências Bibliográficas

- AGRAWAL, D.C.; BANERJEE, A.K.; KOLALA, R.R.; DHAGE, A.B.; KULKARNI, A.V.; NALAWADE, S.M.; HAZRA, S.; KRISHNAMURTHY, K.V. *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 647-652, 1997.
- BATISTA, R.C.; CARVALHO, J.M.F.C.; ALMEIDA, F. de A.C.; MATA, M.E.R.M.C. Micropropagação *in vitro* de três cultivares de gergelim. **Revista de Oleaginosa e Fibrosa**, v. 5, n. 3, p. 397-404, 2001.
- BORÉM, A.; SANTOS, F.R. **Biotechnologia Simplificada**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2004. p.189 – 201.
- CALDAS, L.S., HARIDASAN, P., FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPH, 1998. v. 1, p. 87-104.
- CARVALHO, J.M.F.C.; SOUZA, D.M. de; SANTOS, J.W. dos. Indução de superbrotamento e regeneração de planta *in vitro* na cultivar de algodão CNPA 7H. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.4, n.2, p. 61 - 65, maio – ago. 2000.
- FURTADO, C.M. Micropropagação da cultivar BR-1 de amendoim (*Arachis hipogaea* L.) *in vitro* utilizando citocininas. 2004. 57f. Monografia (Graduação) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2004.
- LIMA, L.H.G de M. *et al.* Indução *in vitro* de múltiplos brotos a partir de meristema apical de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) da cultivar ITA-90 II. In: 55º CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 55; ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICOS DE MG, BA E ES, 26., 2004, Viçosa. **Anais...** p. 138.
- MANTELL, S.H., MATTHEWS, J.A., MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia**

**em plantas:** uma introdução à engenharia genética em plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p. 101-106.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**, v.15, p. 473-497, 1962.

RICHETTI, A.; MELO FILHO, G.A. de. Aspectos socioeconômicos do algodoeiro. In: **Algodão: tecnologia de produção**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste/Embrapa Algodão, 2001. p. 11-22.

SAS/STAT. User's guide. In: SAS Institute. **SAS Online Doc: Version 9.1.3**, Cary, 2003. CDRom

SOUSA, E.B.de MELO. **Técnica de micropropagação *in vitro* de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) CNPA 97.668**. 2004. 44f. Monografia (Graduação) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2004.

SOUSA, E.B. de M.; LIMA, L.H.G. de M.; CARVALHO, J.M.F.; SANTOS, J.W. dos; VIDAL, M.S. Indução *in vitro* de superbrotamento a partir de meristema apical de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) CNPA 97-668. In: 55º CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 55; ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICOS DE MG, BA E ES, 26.,2004, Viçosa. **Anais...** p. 178.





**Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento**

